

Гигиена питания

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Беляева Н.Н.¹, Вострикова М.В.¹, Демина Н.Н.²

ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСА ВИТАМИНОВ А и Е НА СТРУКТУРУ ТОНКОЙ КИШКИ КРЫС ПОСЛЕ ДВУХНЕДЕЛЬНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ОДНОСТЕННЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК И ЧЕРЕЗ ТРИ МЕСЯЦА ПОСЛЕ НЕГО

¹Федеральное бюджетное учреждение науки «Федеральный научный центр им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора, 141014, Московская область, Мытищи;

²Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 119991, Москва

Введение. В настоящее время возрастает число работ, направленных на изучение влияния углеродных нанотрубок (УНТ), в том числе одностенных (оУНТ), на организм, и появляются исследования по поиску средств, способствующих снизить их токсическое воздействие, например, соединений, обладающих антиоксидантными свойствами.

Материал и методы. У пятнадцати групп животных изучено внутрижелудочное воздействие двухнедельное с оУНТ в дозах 0,05 и 0,5 мг/кг и однократное с оУНТ в дозе 5 мг/кг, а также комплекс с витаминами А и Е (АЕ) в дозе 25,3 мг/кг на тонкую кишку самцов крыс Wistar и у этой же партии животных через три месяца после.

Результаты. В двухнедельном эксперименте при воздействии оУНТ в дозах 0,05 и 0,5 мг/кг показана дозовая зависимость по показателям снижения числа нормальных ворсин при увеличении числа разрушенных, тогда как через три месяца среди разрушенных ворсин увеличивалось их число с апикальным некрозом. После однократного воздействия оУНТ в дозе 5 мг/кг через три месяца также увеличивалось число ворсин с апикальным некрозом. Двухнедельное воздействие АЕ снижало число нормальных ворсин, увеличивая число разрушенных форм, а через три месяца повышалось число ворсин с апикальным некрозом. Комплексное двухнедельное воздействие АЕ и оУНТ в дозах 0,05 и 0,5 мг/кг снижало число нормальных ворсин при повышении числа разрушенных; через три месяца после так же, как и при других воздействиях, патология развивалась, увеличивая число ворсин с апикальным некрозом.

Заключение. Доказано токсическое воздействие оУНТ и АЕ на тонкую кишку крыс при раздельном и комплексном применении, увеличивающееся в восстановительном периоде.

Ключевые слова: одностенные углеродные нанотрубки (оУНТ); комплекс витаминов А и Е (АЕ); тонкая кишка крыс Wistar.

Для цитирования: Беляева Н.Н., Вострикова М.В., Демина Н.Н. Влияние комплекса витаминов А и Е на структуру тонкой кишки крыс после двухнедельного воздействия одностенных углеродных нанотрубок и через три месяца после него. *Гигиена и санитария*. 2019; 98(12): 1414-1419. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2019-98-12-1414-1419>

Для корреспонденции: Беляева Наталья Николаевна, доктор биол. наук, профессор, вед. науч. сотр. отд. токсикологии и гигиены окружающей среды ФБУН ФНЦ им. Ф.Ф. Эрисмана Роспотребнадзора, 141014, Московская область, Мытищи. E-mail: belnatnik@mail.ru

Благодарность. Авторы благодарят сотрудников лаборатории: зав. лаб., доктора биол. наук, профессора Михайлову Р.И. за постановку эксперимента, канд. мед. наук Мамонова Р.А. и Алексееву А.В. за проведение эвтаназии животных и их вывод из эксперимента, лаборантов-исследователей Бахареву Т.Д. и Суравцову В.А. за подготовку гистологического материала к просмотру.

Финансирование. Работы выполнены в рамках государственного задания Министерства здравоохранения России (государственный регистрационный номер 115072870026).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов: выбор показателей, их определение, стереометрическое и морфометрическое определение, фотографирование, статистический анализ, обсуждение результатов, написание статьи – Беляева Н.Н.; определение части показателей, их стереометрическая и морфометрическая оценка, обсуждение результатов – Вострикова М.В.; обсуждение результатов, редактирование статьи – Демина Н.Н.

Поступила 04.03.2019

Принята к печати 17.09.19

Опубликована: декабрь 2019

Belyaeva N.N.¹, Vostrikova M.V.¹, Demina N.N.²

THE EFFECT OF VITAMINS A AND E ON THE STRUCTURE OF THE SMALL INTESTINE OF RATS AFTER TWO WEEKS AND THEN THREE MONTHS FOLLOWING EXPOSURE TO SINGLE-WALLED CARBON NANOTUBES

¹F.F. Erisman Federal Research Center of Hygiene, Mytishchi, 141014, Russian Federation;

²Centre for Strategic Planning, Russian Ministry of Health, Moscow, 119121, Russian Federation

Introduction. Currently, there is a number of works aimed at studying the effect of carbon nanotubes (UNT), including single-walled (oUNT), on the body and there are studies to find means to reduce their toxic effects, such as compounds with antioxidant properties.

Material and methods. In fifteen groups of animals there were studied intragastric effects of two weeks with the count at doses of 0.05 and 0.5 mg/kg and a single dose of 5mg/kg, as well as complex with vitamins A and E (AE) at a dose of 25.3 mg / kg on the small intestine of male Wistar rats, and in the same batch of animals three months later.

Results. In a two-week experiment under the influence of oUNT in doses of 0.05 and 0.5 mg/kg there was shown the dose dependence on indices of reducing the number of normal villi with an increase in the number of destructured ones, whereas three months later among the destructured villi were increased in number with apical necrosis. After a single exposure of oUNT at a dose of 5mg/kg three months later, there also was increased the number of villi with apical necrosis. Two-weeks exposure of AE reduced the number of normal villi, increasing the number of degraded forms, and three months later the number of villi with apical necrosis increased. Two-weeks complex exposure of AE and oUN at doses of 0.05 and 0.5 mg/kg reduced the number of normal villi with an increasing number of destructured ones; three months later, as well as with other effects, the pathology developed, increasing the number of villi with apical necrosis.

Conclusion. The toxic effect of oUNT and AE on the small intestine of rats with the separate and complex applications, increasing in the recovery period, was proved.

Key words: single-walled carbon nanotubes (oUNT); complex vitamins A and E (AE); Wistar rats.

For citation: Belyaeva N.N., Vostrikova M.V., Demina N.N. The effect of vitamins a and e on the structure of the small intestine of rats after two weeks and then three months following exposure to single-walled carbon nanotubes. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)* 2019; 98(12): 1414-1419. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2019-98-12-1414-1419>

For correspondence: Natalia N. Belyaeva, MD, Ph.D., DSci., leading researcher of the Department of toxicology and environmental hygiene of the F.F. Erisman Federal Research Center of Hygiene, Mytishchi, 141014, Russian Federation. E-mail: belnatnik@mail.ru

Information about the authors: Belyaeva N.N., <http://orcid.org/0000-0003-2504-9815>; Vostrikova M.V., <https://orcid.org/0000-0003-4090-52025>; Demina N.N., <https://orcid.org/0000-0002-8386-911X>

Gratitude. The authors are grateful to the staff of the laboratory: the head of the laboratory, Dr. Biol. Sciences, prof. Mikhailova R.I. for the formulation of the experiment, Ph.D. Mamonov R.A. and Alekseeva A.V. for conducting animal euthanasia and their withdrawal from the experiment, laboratory assistants-researchers Bahareva T.D. and Suravtsova V.A. for the preparation of histological material for viewing.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. The work was performed in the framework of the State Mission of the Ministry of Health of Russia (state registration number 115072870026).

Contribution: Belyaeva N.N. – selection of indices, their determination, stereometric and morphometric determination, photographing, statistical analysis, discussion of the results, writing an article; Vostrikova M.V. – definition of a part of indices, their stereometric and morphometric estimation, discussion of results; Demina N.N. – discussion of the results, editing the article; Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all co-authors.

Received: March 4, 2019

Accepted: September 17, 2019

Published: December 2019

Введение

Во всём мире проводится изучение влияния наночастиц на организм, однако оно проводится крайне недостаточно, что не позволяет в должной мере оценить риски их воздействия [1–4]. Было показано, что для раскрытия влияния наночастиц на организм при структурно-функциональном определении их токсичности необходима экспериментальная оценка *in vivo* воздействия различных доз на теплокровных лабораторных животных [5–8]. Одним из наиболее востребованных видов современных наноматериалов являются наноструктурированные формы углерода, а именно углеродные нанотрубки (УНТ). Выделяют одностенные (oУНТ), короткие (кУНТ), олигостенные (2–3 слоя) и многостенные (МУНТ), где МУНТ представляют собой один из самых популярных (сравнимых только с наночастицами серебра и диоксида титана) объектов нанотоксикологических исследований [8, 9]. В связи с неясностью вопроса биосовместимости и цитотоксичности УНТ возможность их применения в биомедицине тормозится. Перед их внедрением в практическое здравоохранение необходимо предусмотреть все возможные последствия их внедрения [9–12], тем более что УНТ предполагают применять во многих различных технических приложениях, в том числе и в качестве сорбирующего материала в процессе водоподготовки [13].

Аналізу большого числа ранних работ по влиянию УНТ на разные биологические объекты посвящён ряд статей [8, 9, 14], тогда как работы применительно к воздействию УНТ на теплокровные организмы освещаются в литературе в значительной меньшей степени [2, 4]. Однако в последнее время число работ, посвящённых влиянию УНТ на организм не только теплокровных животных [2–8, 15–24], но и человека [25, 26], возрастает.

Волокнистая структура нанотрубок и длительная персистенция в тканях придают им сходство с асбестом. Было показано, что УНТ транслоцируются до лёгких, скапливаются в них, а дальше происходит то, что очень напоминает попадание в лёгкие частиц асбеста, которое может привести к раку [3, 8]. Однако ряд исследователей нашли, что УНТ оказывали токсические эффекты (и даже более выраженные, чем асбест) за счёт повреждения мембраны и активации макрофагов, при этом были отвергнуты такие механизмы цитотоксичности, как оксидативный стресс, экспрессия генов, апоптоз. Кроме того, они считают, что МУНТ способны оказывать токсические эффекты, даже не проникая в клетку, в отличие от волокон асбеста [8]. При трансмиссионной электронной микроскопии не обнару-

жились oУНТ внутри альвеолярных клеток человека A549 [27]. Особый интерес представляет поиск средств, направленных на снижение их токсического влияния на организм, например, соединений, обладающих, как предполагают, антиоксидантными свойствами [22].

Нами ранее было исследовано влияние различных УНТ (МУНТ, кУНТ, oУНТ) [5, 20, 22] на печень мышей и крыс, а также МУНТ на тонкую кишку крыс и мышей [18, 19], однако было крайне интересно изучить и сравнить эффект воздействия МУНТ с oУНТ на тонкую кишку крыс. Ранее [22] было показано отсутствие защитного действия комплекса витаминов А и Е на процессы повреждения печени от oУНТ. Поэтому необходимо выяснить, наблюдается ли такой же эффект на тонкую кишку крыс.

Материал и методы

oУНТ имеет промышленное название «Tuball» и производится ООО «Плазмохимические технологии» (г. Новосибирск). Подробно характеристика oУНТ представлена в статье по воздействию oУНТ на печень крыс, так как органы (печень и тонкая кишка) брались из одного и того же эксперимента [22]. Также был выбран тот же комплекс витаминов А и Е (АЕ) в дозе 25,3 мг/кг (витамина Е – 25,2 мг/кг и витамина А – 0,1 мг/кг), где их применение, как считают, обладает антиоксидантным и иммуностимулирующим действием. В данном эксперименте oУНТ для возможности его внутрижелудочного введения диспергировали перемешиванием магнитной мешалкой в подсолнечном масле из расчёта 0,5 мл масла на 100 г массы тела животных, в случае комплексного воздействия добавляли туда 25,3 мг/кг АЕ из расчёта рекомендованной суточной дозы альфа-токоферола ацетата в пересчёте на белых самцов крыс Wistar (Филиал «Андреевка» ФГБУ «НЦБМТ» РАМН, масса тела к введению в эксперимент – 170–200 г), которые содержались в камерах на стандартной диете при свободном доступе к воде. Исследовали по 6 животных из каждой группы и от каждого животного не менее 500 ворсин на разных срезах тонкой кишки.

У 15 групп животных изучено двухнедельное внутрижелудочное воздействие oУНТ и АЕ на тонкую кишку крыс, а также у этой же партии животных через три месяца после двухнедельного эксперимента; при этом в отличие от двухнедельного воздействия через три месяца группы получили дополнительный шифр (2). Исследовано: а) воздействие oУНТ в дозах:

Таблица 1

Структурно-функциональные показатели тонкой кишки двух контрольных групп крыс

| Число ворсин, % | Значения показателей – М: (доверительные границы средней) | | | | | |
|--|---|-----------------------|-------------------|-----------------------------------|-----------------------|--------------------|
| | общий контроль (К) | контрольные группы | | контрольные группы через 3 месяца | | |
| | | с подсолнечным маслом | интактный | общий контроль (К) | с подсолнечным маслом | интактный |
| | | (2) | (1) | | | |
| Без нарушения целостности всасывающей каёмки | 81,5:(64,2 ÷ 98,8) | 82,4:(60,4 ÷ 100) | 80,6:(41,0 ÷ 100) | 47,5:(30,6 ÷ 64,4) | 50,2:(19,3 ÷ 80,7) | 44,4:(14,1 ÷ 74,7) |
| Деструктурированных ворсин, из них: | 18,5:(1,2 ÷ 35,8) | 17,6:(0 ÷ 39,6) | 19,4:(2,1 ÷ 36,7) | 52,5:(35,6 ÷ 69,4) | 49,8:(18,9 ÷ 80,9) | 55,6:(25,3 ÷ 85,9) |
| с апикальным некрозом | 10,4:(0,6 ÷ 19,2) | 10,4:(0 ÷ 26,4) | 10,4:(0-33,0) | 8,6:(4,9 ÷ 12,3) | 8,0:(2,9 ÷ 13,2) | 9,4:(2,2 ÷ 16,6) |
| С усилением пролиферации эпителия | 4,0:(0,6 ÷ 7,4) | 4,0:(0 ÷ 9,5) | 4,0:(0 ÷ 11,7) | 5,5:(3,1 ÷ 7,9) | 5,7:(1,0 ÷ 10,4) | 5,4:(0,8 ÷ 7,4) |

0,05 мг/кг (3 и 3 (2) группы) и 0,5 мг/кг (4 и 4 (2) группы); б) воздействие АЕ в дозе 25,3 мг/кг (10 и 10 (2) группы); в) комплексное воздействие оУНТ, 0,05мг/кг и АЕ (11 и 11 (2) группы); оУНТ, 0,5 мг/кг и АЕ (12 и 12 (2) группы); г) две группы крыс были контрольными: интактный контроль (1 и 1 (2) группы) и группы животных, получавших подсолнечное масло (2 и 2 (2) группы); д) через три месяца исследовалась группа крыс, получившая однократно оУНТ в дозе 5 мг/кг (7-я группа). Кусочек тонкой кишки фиксировали в забуференном формалине, парафиновые блоки органа резали на электронном микротоме Hesting с толщиной срезов около 4–6 мкр, окрашивали гематоксилином и эозином. Срезы просматривали на цифровом биологическом микроскопе Leica DM 2500 с программным обеспечением перевода изображения на экран компьютера при увеличениях микроскопа 10 × 20, 10 × 40, 10 × 90. Определяли 4 показателя: число нормальных ворсин (без нарушения целостности всасывающей каемки, в %), деструктурированных (с нарушением целостности всасывающей каёмки и изменением конфигурации ворсин, в %), среди деструктурированных – ворсины с апикальным некрозом, в %, увеличение числа ворсин с пролиферацией эпителия в верхней части ворсины, в %.

Условия проведения и вывода животных из эксперимента проводили с соблюдением международных принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным и требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу Минздрава СССР от 12.08.1977 г., № 755). Животные выводились из эксперимента путём эвтаназии с помощью цервикальной дислокации. Статистически определяли М и доверительные границы средней с уровнем достоверности 95%. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты

Так как показатели двух контрольных групп крыс достоверно не отличались между собой, данные по ним объединены в одну контрольную группу (К, табл. 1, рис. 1, см. на 2-й стр. обложки). При двухнедельном воздействии оУНТ в дозе 0,05 мг/кг (табл. 2) достоверных изменений не обнаружено. Однако при этом наблюдалась тенденция к изменению ряда показателей. Так, практически в 2 раза снижалось число нормальных ворсин с параллельным увеличением числа деструктурированных. Число ворсин с апикальным некрозом увеличилось в 1,7 раза. Повышение дозы оУНТ до 0,5 мг/кг (см. табл. 2) привело к значительному достоверному снижению более чем в 2 раза числа нормальных ворсин с параллельным увеличением более чем в 3 раза числа деструктурированных, которое сопровождалось тенденцией к увеличению в 1,8 раза количества ворсин с апикальным некрозом. Пролиферация эпителия не отмечалась.

Через 3 мес после двухнедельного воздействия оУНТ в обеих дозах (см. табл. 2, группы 3 (2) и 4 (2); рис. 2, см. на 2-й стр. обложки) достоверные изменения по отношению к контрольной группе трехмесячного эксперимента – К(2) – значительно усиливаются только по числу ворсин с апикальным некрозом – в 2,6 раза в группе 3 (2) и в 4,6 раза в группе 4 (2). Число ворсин с усилением пролиферации эпителия имеет только тенденцию к увеличению – в 1,6 раза при воздействии оУН в дозе 0,05 мг/кг и в 1,9 раза – в дозе 0,5 мг/кг из-за большого разброса в группах по этому показателю.

Через 3 мес после однократного воздействия оУНТ в дозе 5 мг/кг (табл. 3, группа 7) достоверно возрастает только число

Таблица 2

Двухнедельное воздействие оУНТ на структурно-функциональные показатели в тонком кишечнике

| Число ворсин, % | Значения показателей в группах – М: (доверительные границы средней) | | | | |
|-----------------------------------|---|--------------------|---------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | контроль | воздействие оУНТ | | | |
| | | 2-недельное в дозе | | через 3 мес в дозе | |
| | | 0,05 мг/кг | 0,5 мг/кг | 0,05 мг/кг | 0,5 мг/кг |
| группа | | | | | |
| К / К (2) | 3 | 4 | 3 (2) | 4 (2) | |
| Нормальных | 81,5:(64,2–98,8) / 47,5:(30,6 ÷ 64,4) | 46,0:(6,9–85,1) | 39,2:(25,0–53,4)* от К | 60,7:(45,3 ÷ 76,1) | 44,6:(19,8 ÷ 69,4) |
| Деструктурированных, из них: | 18,5:(12,0–35,8) / 52,5:(35,6 ÷ 69,4) | 54,0:(14,9–93,1) | 60,8:(46,5–75,0)* от К | 39,3:(23,9 ÷ 54,7) | 55,4:(30,6 ÷ 80,2) |
| с апикальным некрозом | 10,4:(0,6–19,2) / 8,6:(4,9 ÷ 12,3) | 17,6:(7,7–27,5) | 19,2:(13,2–25,2) | 24,0 (15,4 ÷ 32,6)* от К(2) | 39,2 (19,2 ÷ 58,8)* от К(2) |
| С усилением пролиферации эпителия | 4,9:(0,6–7,4) / 5,5:(3,1 ÷ 7,9) | 4,2:(0–9,7) | 4,3:(1,3–7,9) | 8,8:(1,1 ÷ 16,5) | 10,6:(0,7 ÷ 20,5) |

Примечание. Здесь и в табл. 3: * – достоверные отличия от групп при $p < 0,05$.

Таблица 3

Влияние однократного воздействия оУНТ через 3 мес, двухнедельного воздействия АЕ и через 3 мес после, комплексного двухнедельного воздействия АЕ с оУНТ и через 3 мес после

| Число ворсин, % | Значения показателей в разных группах – М: (доверительные границы средней) | | | |
|-----------------------------------|--|--|--|---|
| | через 3 мес после однократного воздействия оУНТ в дозе 5 мг/кг | АЕ / АЕ (2) | оУНТ – 0,05 мг/кг + АЕ | оУНТ – 0,5 мг/кг + АЕ |
| | группа | | | |
| | 7 | 10 / 10 (2) | 11 / 11 (2) | 12 / 12 (2) |
| Нормальных | 42,3*(38,4 ÷ 46,2) от К | 52,2*(46,1 ÷ 58,3) от К / 39,8: (14,1 ÷ 65,5) | 45,7*(27,7 ÷ 63,7) от К / 37,5: (10,5 ÷ 64,5) | 50,5*(37,6 ÷ 63,4) от К / 28,3: (5,1 ÷ 51,5) |
| Деструктурированных, из них: | 57,7*(53,8 ÷ 61,6) от К | 47,8*(41,7 ÷ 53,9) от К / 60,2: (34,5 ÷ 85,9) | 54,3:(36,3 ÷ 72,3) / 62,5:(35,5 ÷ 89,5) | 49,5 ± 5,3 (13,6 ÷ 62,4) / 71,7:(48,5 ÷ 94,9) |
| с апикальным некрозом | 48,0*(42,5 ÷ 53,5) от К, К (2), 3, 3 (2), 4 | 16,4:(12,5 ÷ 20,3) / 50,7*(23,7 ÷ 77,7) от К (2) | 17,2:(12,1 ÷ 22,3) / 48,8*(23,9–73,7) от К (2) | 28,5:(18,2 ÷ 38,8) / 59,5*(34,6 ÷ 84,4) от К (2), 3 |
| С усилением пролиферации эпителия | 7,5:(5,9 ÷ 9,1) | 11,4:(4,2 ÷ 18,6) / 4,1:(0 ÷ 8,2) | 10,3:(0,9 ÷ 19,7) / 4,0:(0,6 ÷ 7,4) | 13,7:(6,8 ÷ 20,6) / 7,8:(5,9 ÷ 9,1) |

ворсин с апикальным некрозом в 2–2,7 раза по отношению к группам К, К (2), 3, 3 (2), 4, тогда как другие показатели достоверно не отличаются от двухнедельного контроля.

Двухнедельное воздействие АЕ (см. табл. 3, группа 10) достоверно в 1,8 раза снижает число нормальных ворсин при достоверном в 2,6 раза повышении числа деструктурированных. Апикальные некрозы и пролиферация эпителия имеют только тенденцию к повышению. Через 3 мес после двухнедельного воздействия АЕ (см. табл. 3, группа 10 (2)) достоверно по отношению к К(2) в 1,9 раза повышается число ворсин с апикальным некрозом. Остальные показатели достоверно не меняются.

При комплексном двухнедельном воздействии АЕ и оУНТ в дозе 0,05 мг/кг (см. табл. 3, группа 11) достоверные изменения наблюдаются по снижению нормальных ворсин. Аналогичная картина сохраняется и при увеличении в комплексном воздействии с АЕ дозы оУНТ до 0,5 мг/кг (см. табл. 3, группа 12).

Через 3 мес комплексного воздействия оУНТ с АЕ (см. табл. 3, группы 11 (2) и 12 (2); рис. 3, см. на 2-й стр. обложки) в группе 11 (2) по отношению к К (2) достоверно в 4,7 раза повышается число ворсин с апикальным некрозом, а в группе 12 (2) их число увеличивается уже в 6,9 раза. Двукратное превышение этого показателя в группе 12 (2) наблюдается и по отношению к группе 3. Остальные показатели значимо не меняются.

Таким образом:

1. В двухнедельном эксперименте при воздействии оУНТ в дозах 0,05 и 0,5 мг/кг показана дозовая зависимость по показателям снижения числа нормальных ворсин при параллельном увеличении числа деструктурированных, тогда как через три месяца среди деструктурированных ворсин достоверно по отношению к контролю трехмесячного эксперимента увеличивалось число ворсин с апикальным некрозом.

2. После однократного воздействия оУНТ в дозе 5 мг/кг через 3 мес достоверно по отношению не только к контрольным группам, но и к группам с воздействием оУНТ увеличивалось число ворсин с апикальным некрозом.

3. Двухнедельное воздействие АЕ оказывало токсическое воздействие на тонкий кишечник, достоверно снижая число нормальных ворсин и увеличивая число деструктурированных форм, а через три месяца достоверно по отношению к 3-месячному контролю повышая число ворсин с апикальным некрозом. Остальные показатели достоверно не менялись.

4. Комплексное двухнедельное воздействие АЕ и оУНТ в дозе 0,05 мг/кг достоверно снижало число нормальных ворсин. Аналогичная картина сохранялась и при увеличении дозы оУНТ до 0,5 мг/кг в комплексном воздействии с АЕ. Через три месяца комплексного воздействия АЕ с оУНТ в дозах 0,05 и 0,5 мг/кг достоверно увеличивалось число ворсин с апикальным некрозом.

5. Пролиферация эпителия ворсин ни в одном эксперименте достоверно не менялась, хотя обнаруживалась достаточно выраженная пролиферация через три месяца после двухнедельного воздействия оУНТ в обеих дозах и в двухнедельном эксперименте при комплексном воздействии оУНТ и АЕ.

6. Таким образом, в восстановительном периоде (через 3 мес после двухнедельного и однократного воздействия) усиливались реакции повреждения тонкого кишечника, когда среди деструктурированных ворсин увеличилось число ворсин с апикальным некрозом.

Обсуждение

В данном эксперименте при 2-недельном воздействии оУНТ по двум показателям показана дозовая зависимость, которая также была определена при воздействии МУНТ [19], а также по некоторым из показателей при пероральном трёхмесячном воздействии оУНТ в дозах, близких к нашему эксперименту, на крысах Wistar, что исследователи предположительно связывают с процессами агрегации оУНТ [28].

Анализируя результаты по оценке воздействия оУНТ на структурно-функциональные показатели тонкой кишки крыс в данном эксперименте, отмечаем аналогичный ответ как на шестимесячное воздействие МУНТ на этот орган крыс [19], так и при 2-недельной экспозиции на мышей [18], выражающееся в развитии апикальных некрозов. Нами тогда было высказано предположение, что, как и асбест, попадая в пищеварительный тракт, УНТ или их осколки повреждают верхушечный эпителий, который со временем

от снижения целостности щёточной каёмки затрагивает всю верхушку ворсин, приводя к апикальному некрозу, что нашло подтверждение в работе [21]. Тогда встаёт вопрос – действительно ли пусковым механизмом является, как считают многие исследователи [29–31], оксидантный стресс? С другой стороны, некоторые предлагают считать пусковым механизмом прямую или непрямую активацию купферовских клеток в печени, лёгких, что является причиной развития дистрофических и воспалительных изменений в клетках [24], при этом оУНТ, попадая в пищеварительный тракт, вызывает повреждения не только в месте прямого контакта – тонкой кишке, как было показано при воздействии МУНТ [18, 19], но и в удалённом органе – печени [21, 22].

Наше исследование скорее предполагает второй вариант развития событий, когда сначала идёт прямое, как в данном случае, повреждение эпителия верхушки ворсин, вызывая дистрофические изменения, которые в свою очередь запускают окислительный стресс, усугубляющий развитие патологической реакции, приводящей к развитию апикальных некрозов. Этот пусковой механизм развития патологического процесса не снижается и в восстановительном периоде через три месяца после воздействия оУНТ.

АЕ сам по себе оказывает токсическое воздействие на тонкий кишечник, а при его комплексном применении с оУНТ не снижает токсический эффект. Возможны различные варианты отрицательного воздействия комплекса оУНТ и АЕ: механизм воздействия оУНТ не связан с оксидантным стрессом, поэтому этот комплекс не предохраняет от повреждения ворсины, либо, как считают [32] по результатам проведённого исследования воздействия оУНТ с АЕ, ретинол усиливал прооксидантное действие АЕ, вызывая появление биохимических маркёров мальабсорбции предположительно за счёт замедления ретинолом репарации эпителиоцитов кишечника, повреждаемых оУНТ.

Заключение

Доказано токсическое воздействие оУНТ и АЕ на тонкий кишечник крыс при раздельном и комплексном применении, увеличивающееся в восстановительном периоде.

Литература

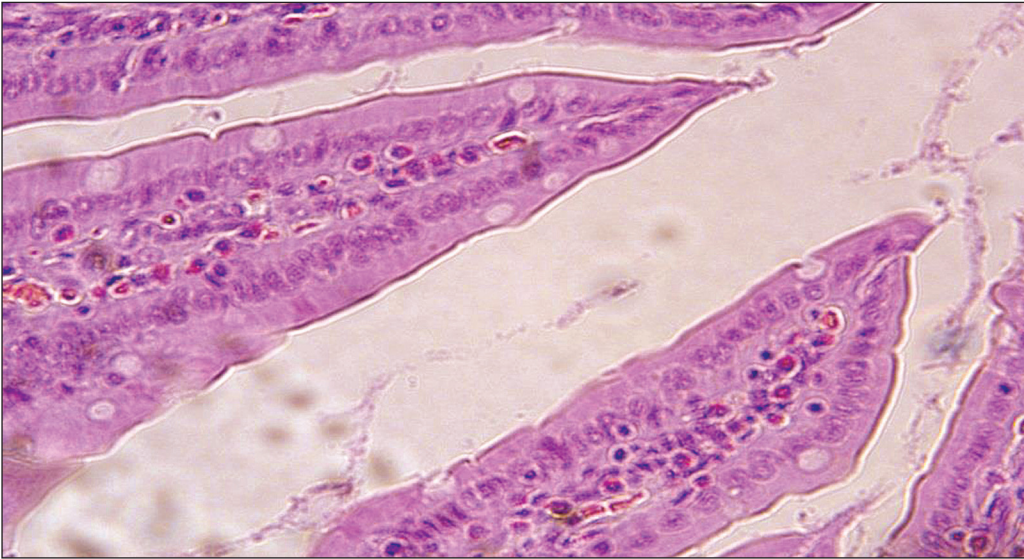
(пп. 11, 12, 14–16, 25–27, 29–31 см. References)

1. Онищенко Г.Г. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации «О надзоре за производством и оборотом продукции, содержащей наноматериалы». Информационное письмо Роспотребнадзора. 2007; № 0100.4502–07–02 от 02.05.2007.
2. Филатов Б.Н. Медико-гигиенические проблемы нанотоксикологии. *Материалы научной конференции «Нанотоксикология: достижения, проблемы и перспективы»*. Волгоград. 2014; 7–10.
3. Фатхутдинова Л.М., Халиуллин Т.О., Залялов Р.Р. Токсичность искусственных наночастиц. *Казанский медицинский журнал*. 2009; 90 (4): 578–84.
4. Фатхутдинова Л.М., Халиуллин Т.О., Шведова А.А. Оценка риска здоровью при воздействии углеродных нанотрубок от токсикологии к эпидемиологическим исследованиям (обзор современного состояния проблемы). *Российские нанотехнологии*. 2015; 10 (5–6): 144–50.
5. Беляева Н.Н. Структурно-функциональная клеточная оценка воздействия наночастиц и нанопроизводства на организм теплокровных животных. *Сборник научных трудов: «Биомедицина XXI века: достижения и перспективные направления развития»* (под ред. академ. Ю.А. Рахманина). М.: Издательство Российской академии естественных наук; 2016: 45–52.
6. Беляева Н.Н., Вострикова М.В., Юрченко В.В., Михайлова Р.И., Каменецкая Д.Б., Рыжова И.А. Оценка воздействия нанотрубок на организм теплокровных лабораторных животных. *Научный вестник ЯНАО*. 2017; 96 (3): 79–81.
7. Гмошинский И.В., Хотимченко С.А., Ригер Н.А., Никитюк Д.Б. Углеродные нанотрубки: механизмы действия, биологические маркёры и оценка токсичности *in vivo*. *Гигиена и санитария*. 2017; 2: 176–86.
8. Аманмурадов А.Х., Беляева Н.Н. Воздействие одностенных углеродных нанотрубок на организм теплокровных животных. *Материалы Международного форума Научного совета РФ «Экологические проблемы современности: выявление и предупреждение неблагоприятного воздействия детерминированных факторов и климатических изменений на окружающую среду и здоровье населения»* (под ред. акад. Ю.А. Рахманина). М.; 2017: 31–2. ISBN 978-5-95-00159-0-8.
9. Саяпина Н.В., Сергиевич А.А., Баталова Т.А., Новиков М.А., Асладчева А.Н., Чайка В.В. и соавт. Биологическая и токсикологическая опасность углеродных нанотрубок: обзор российских публикаций. *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*. 2014; 16 (5): 949–53.
10. Митрофанова И.В., Мильто И.В., Суходоло И.В., Васюков Г.Ю. Возможности биомедицинского применения углеродных нанотрубок. *Бюллетень Сибирской медицины*. 2014; 14 (1): 135–44.
13. Беляева Н.Н., Вострикова М.В., Демина Н.Н. Структурно-функциональная оценка возможности использования в водоподготовке одностенных углеродных нанотрубок. *Материалы Международного форума Научного совета РФ «Экологические проблемы современности: выявление и предупреждение неблагоприятного воздействия детерминированных факторов и климатических изменений на окружающую среду и здоровье населения»* (под ред. акад. Ю.А. Рахманина). М.; 2017: 44–6. ISBN 978-5-95-00159-0-8.
17. Рыбалкин С.П., Михина Л.В., Онацкий Н.М. Изучение токсичности наноструктурированного углерода в форме одностенных углеродных нанотрубок и укороченных одностенных углеродных нанотрубок при ингаляционном пути поступления крысам. *Прикладная токсикология*. 2013; 4: 32–9.
18. Беляева Н.Н., Михайлова Р.И., Сычева Л.П., Савостикова О.Н., Зеленина Е.А., Гасимова З.М. и соавт. Оценка влияния многослойных углеродных нанотрубок на морфофункциональное клеточное состояние тонкого кишечника мышей. *Гигиена и санитария*. 2012; 6: 58–61.
19. Беляева Н.Н., Сычева Л.П., Савостикова О.Н. Структурно-функциональный анализ 6-месячного воздействия многослойных углеродных нанотрубок на тонкую кишку крыс. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2016; 161 (6): 785–8.
20. Беляева Н.Н. Морфофункциональное исследование воздействия коротких углеродных нанотрубок на печень. *Сборник материалов VIII Международного симпозиума «Экология человека и медико-биологическая безопасность населения»* (под ред. Ю.А. Рахманина). Венгрия–Австрия, 20–29 октября 2012 г.: 13–9.
21. Масютин А.Г., Ерохина М.В., Сычевская К.А., Гусев А.А., Васюкова И.А., Ткачев А.Г. и соавт. Многостенные углеродные нанотрубки индуцируют патологические изменения в органах пищеварительной системы мышей. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2016; 161 (1): 143–8.
22. Беляева Н.Н., Вострикова М.В., Алексеева А.В., Демина Н.Н., Сычева Л.П. Структурно-функциональная оценка воздействия *in vivo* одностенных углеродных нанотрубок и комплекса витаминов А и Е на печень крыс. *Гигиена и санитария*. 2018; 97 (11): 1108-13.
23. Горшенева Е.Б. Дозозависимый эффект многостенных углеродных нанотрубок и частиц сажи при пероральном введении лабораторным мышам. *Нанотехнологии и охрана здоровья*. 2014; 6 (1): 48–55.
24. Убогов А.Ю., Полякова И.А., Гусев А.А., Горшенева Е.Б., Ткачев А.Г. Углеродные нанотрубки как фактор развития воспалительного процесса в печени мышей. *Вестник Тамбовского университета*. 2011; 16 (5): 1338–42.
28. Шнелин В.А., Ригер Н.А., Трушина Э.Н., Мустафина О.К., Маркова Ю.М., Полянина А.С. и соавт. Влияние одностенных углеродных нанотрубок на иммунологические, гематологические, микробиологические показатели крыс Вистар при пероральном введении. *Гигиена и санитария*. 2018; 97 (11): 1114–21.
32. Хрипач Л.В., Михайлова Р.И., Журков В.С., Князева Т.Д., Алексеева А.В., Савостикова О.Н. и соавт. Биохимические маркеры повреждения организма при пероральном введении крысам одностенных углеродных нанотрубок в комбинации с антиоксидантным препаратом «Аевит». *Гигиена и санитария*. 2018; 11: 1122–6.

References

1. Onishenko G.G. Resolution of Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation «About the oversight of the production and circulation of goods containing nanomaterials». Information letter from Rosпотребнадзор (Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Well-Being). N 0100/4502–07–02 from 02.05.2007. (in Russian)
2. Filatov B.N. Medical-hygienic problems of nanotoxicology. *Proceedings of scientific conference “Nanotoxicology: achievements, problems and prospects” [Materialy nauchnoy konferentsii “Nanotoksikologiya: dostizheniya, problemy i perspektivy”]*. Volgograd; 2014: 7–10. (in Russian)
3. Fathutdinova L.M., Haliullin T.O., Zalyalova P.P. Toxicity of artificial nanoparticles. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2009; 90 (4): 578–84. (in Russian)
4. Fathutdinova L.M., Haliullin T.O., Shvedova A.A. Health risk assessment under the influence of carbon nanotubes: from toxicology to epidemiological studies (review of the current state of the problem). *Rossiyskiye nanotekhnologii*. 2015; 1 (5–6): 144–50. (in Russian)

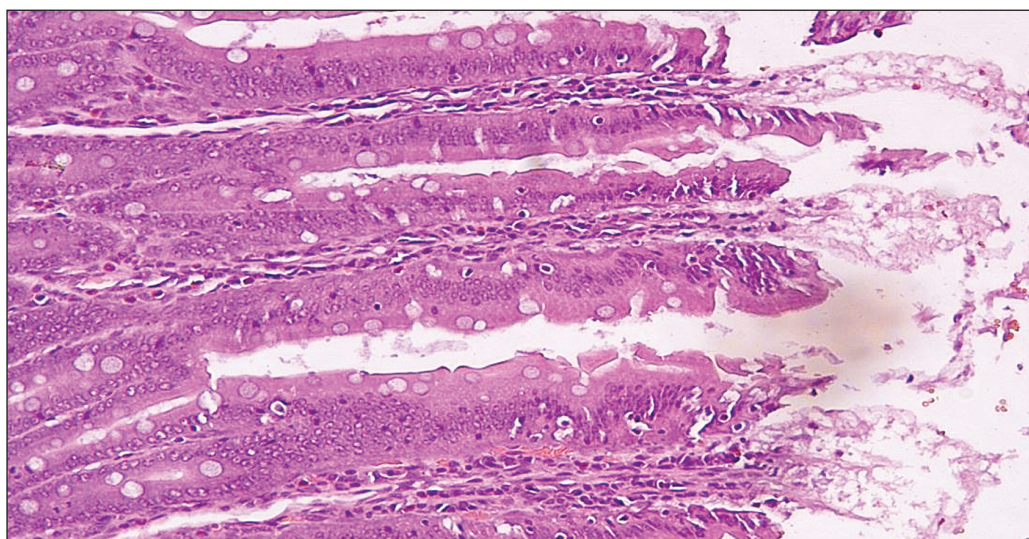
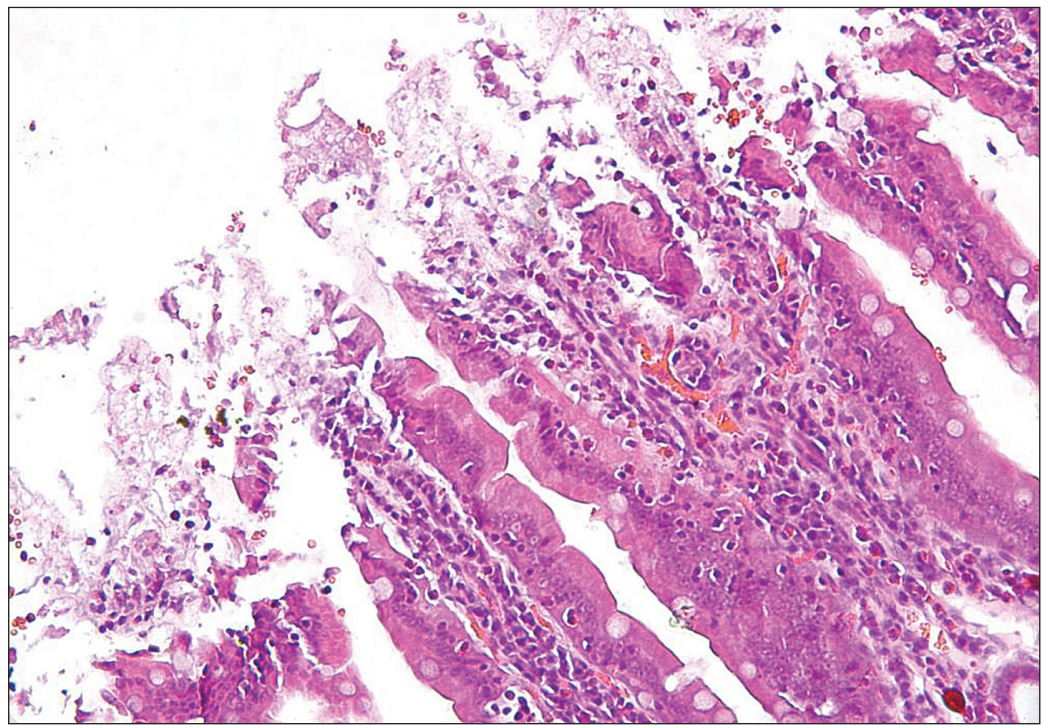
5. Belyaeva N.N. Structural and functional cellular assessment of the effects of nanoparticles and nanoproducts on the body of warm-blooded animals. *On the environment the Collection of scientific works: "Biomedicine XXI century: achievements and perspective directions of development" (edit by academician Yu.A. Rakhmanin) [Sbornik nauchnykh trudov: «Biomeditsina XXI veka: dostizheniya i perspektivnye napravleniya razvitiya» (pod red. akademika Yu.A. Rakhmanina)].* Moscow: Izdatel'stvo Rossiyskoy akademii yestestvennykh nauk; 2016: 45–52. (in Russian)
6. Belyaeva N.N., Vostrikova M.V., Yurchenko V.V., Mikhailova R.I., Kamenetskaya D.B., Ryzhova I.A. Assessment of the impact of nanotubes on the body of warm-blooded laboratory animals. *Nauchnyy vestnik YaNAO [Scientific Bulletin of the YaNAO].* 2017; 96 (3): 79–81. (in Russian)
7. Gmshinsky I.V., Khotimchenko S.A., Rieger N.A., Nikityuk D.B. Carbon nanotubes: mechanisms of action, biological markers and evaluation of toxicity in vivo. *Gigiena i sanitariya [Hygiene and Sanitation, Russian journal].* 2017; 2: 176–86. (in Russian)
8. Amanmuradov A.K., Belyaeva N.N. The impact of single-walled carbon nanotubes on the organism of warm-blooded animals. *Proceedings of the international forum of the Scientific Council of the Russian Federation "Ecological problems of modernity: identification and prevention of adverse effects of deterministic factors and climate change on the environment and public health" [Materialy Mezhdunarodnogo foruma Nauchnogo soveta RF «Ekologicheskiye problemy sovremennosti: vyyavleniye i preduprezhdeniye neblagopriyatnogo vozdeystviya determinirovannykh faktorov i klimaticheskikh izmeneniy na okruzhayushchuyu sredu i zdorov'e naseleniya (pod red. akad. Yu.A. Rakhmanina)].* Moscow; 2017: 31–2. ISBN 978-5-95-00159-0-8. (in Russian)
9. Sayapina N.V., Sergievich A.A., Batalova T.A., Novikov M.A., Asadcheva A.N., Chajka V.V. et al. Biological and toxicological hazards of carbon nanotubes: a review of Russian publications. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiyskoy akademii nauk.* 2014; 16 (5): 949–53. (in Russian)
10. Mitrofanova I.V., Milto V., Sukhodolo I.V., Vasyukov G.Y. Possible biomedical applications of carbon nanotubes. *Byulleten' Sibirskoy Meditsiny [Bulletin of the Siberian Medicine].* 2014; 14 (1): 135–44. (in Russian)
11. Tetley T.D. New perspectives in nanomedicine. *Pharmacol Ther.* 2013; 140 (2): 176–85.
12. Szendi K., Varga C. Lack of genotoxicity of carbon nanotubes in a pilot study. *Anticancer Res.* 2008; 28 (1A): 349–52.
13. Belyaeva N.N., Vostrikova M.V., Demina N.N. Structural and functional assessment of the possibility of using single-wall carbon nanotubes in water treatment. *Proceedings of the international Forum of the Scientific Council. The Russian Federation "Ecological problems of modernity: identification and prevention of adverse effects of deterministic factors and climate change on the environment and public health" (edit by acad. Yu.A. Rakhmanin) [Materialy Mezhdunarodnogo foruma Nauchnogo soveta RF «Ekologicheskiye problemy sovremennosti: vyyavleniye i preduprezhdeniye neblagopriyatnogo vozdeystviya determinirovannykh faktorov i klimaticheskikh izmeneniy na okruzhayushchuyu sredu i zdorov'e naseleniya» (pod red. akad. Yu.A. Rakhmanina)].* Moscow; 2017: 44–6. ISBN 978-5-95-00159-0-8 (in Russian)
14. Smith A.M., Michael C. Carbon nanoparticles charge up old cancer treatment to powerful effect. *Nat Nanotechnol.* 2008; 3: 697.
15. Wang H., Wang J., Deng X. Biodistribution of carbon singlewall carbon nanotubes in mice. *J Nanosci Nanotech.* 2004; 4 (8): 1019–23.
16. Patolla A., McGinnis B., Tchounwou P. Biochemical and histopathological evaluation of functionalized single-walled carbon nanotube in Swiss-Webster mice. *J Appl Toxicol.* 2011; 31 (1): 75–83.
17. Rybalkin S.P., Mihina L.V., Onackij N.M. The study of toxicity of nanostructured carbon in the form of single-wall carbon nanotubes and shortened single-wall carbon nanotubes during inhalation pathways to rats. *Prikladnaya toksikologiya.* 2013; 4 (1): 32–9. (in Russian)
18. Belyaeva N.N., Mihajlova R.I., Sycheva L.P., Savostikova O. N., Zelenkina E.A., Gasimova Z.M. et al. Evaluation of the effect of multi-walled carbon nanotubes on morphofunctional status of the small intestine of mice. *Gigiena i sanitariya [Hygiene and Sanitation, Russian journal].* 2012; 6: 58–61. (in Russian)
19. Belyaeva N.N., Sycheva L.P., Savostikova O.N. Structural-functional analysis of 6-month exposure of multi-walled carbon nanotubes on the small intestine of rats. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny [Bulletin of Experimental Biology and Medicine].* 2016; 161 (6): 785–8. (in Russian)
20. Belyaeva N.N. Morphofunctional study of the impact of the short carbon nanotubes in the liver. *Proceedings of International Symposium "Human ecology and biomedical public safety" (edit by academician Yu.A. Rakhmanin) [Sbornik materialov VIII Mezhdunarodnogo simpoziuma "Ekologiya cheloveka i mediko-biologicheskaya bezopasnost' naseleniya" (pod red. Yu.A. Rakhmanina)].* Hungary–Austria, October 20–29, 2012: 13–9. (in Russian)
21. Masyutin A.G., Erokhin M.V., Sychevskaya K.A., Gusev A.A., Vasyukov I.A., Tkachev A.G. et al. Multi-walled carbon nanotubes induce pathological changes in digestive organs of mice. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny [Bulletin of Experimental Biology and Medicine].* 2016; 161 (1): 143–8. (in Russian)
22. Belyaeva N.N., Vostrikova M.V., Alekseeva A.V., Demina N.N., Sycheva L.P. Structural and functional assessment of in vivo effects of single-walled carbon nanotubes and vitamin A and E complex on rat liver. *Gigiena i sanitariya [Hygiene and Sanitation, Russian journal].* 2018; 97 (11): 1108–13. (in Russian)
23. Gorsheneva E.B. dose-Dependent effect of multi-walled carbon nanotubes and soot particles during oral administration to laboratory mice. *Nanotekhnologii i okhrana zdorov'ya [Nanotechnology and Health].* 2014; 6 (1): 48–55. (in Russian)
24. Ubogov A.Yu., Polyakova I.A., Gusev A.A., Gorshenev E.B., Tkachev A.G. Carbon nanotubes as a factor in the development of the inflammatory process in the liver of mice. *Vestnik Tambovskogo universiteta [Bulletin of Tambov University. Series: Natural and technical Sciences].* 2011; 16 (5): 1338–42. (in Russian)
25. Mills N.L., Amin N., Robinson S.D. Do inhaled carbon nanoparticles translocate directly into the circulation in humans? *Am J Respir Crit Care Med.* 2006; 173 (4): 426–31.
26. Tabet L., Bussy C., Amara N. Adverse effects of industrial multiwalled carbon nanotubes on human pulmonary cells. *J Toxicol Environ Health.* 2009; 72 (2): 60–73.
27. Davoren M., Herzog E., Casey A. In vitro toxicity evaluation of single walled carbon nanotubes on human A549 lung cells. *Toxicol In Vitro.* 2007; 21 (3): 438–48.
28. Shepelin V.A., Rieger N.A., Trushina E.N., Mustafina O.K., Markov Yu.M., Polyana S.A. et al. Effect of single-walled carbon nanotubes on immunological, hematological, microecological indicators of Wistar rats when administered orally. *Gigiena i sanitariya [Hygiene and Sanitation, Russian journal].* 2018; 97 (11): 1114–21. (in Russian)
29. Shvedova A.A., Kisin E.R., Porter D. Mechanisms of pulmonary toxicity and medical applications of carbon nanotubes: Two faces of Janus? *Pharmacol Ther.* 2009; 121 (2): 192–204.
30. Folkmann J.K., Risom L., Jacobsen N.R., Wallin H., Loft S., Møller P. Oxidatively damaged DNA in rats exposed by oral gavage to C60 fullerenes and single-walled carbon nanotubes. *Environ Health Perspect.* 2009; 117 (5): 703–8.
31. Shedova A.A., Pietrousti A., Fadal B., Kagan V.E. Mechanisms of carbon nanotube-induced toxicity. Focus on oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2012; 261 (2): 121–33.
32. Khripach L.V., Mikhailova R.I., Zhurkov V.S., Knyazeva T.D., Alekseev V.A., Savostikova O.N. et al. Biochemical markers of damage to the organism when administered orally to rats of single-walled nanotubes in combination with the antioxidant drug "Aevitum". *Gigiena i sanitariya [Hygiene and Sanitation, Russian journal].* 2018; 97 (11): 1122–6. (in Russian)



◀ Рис.1. Нормальные ворсины тонкой кишки контрольной крысы 2-недельного эксперимента (группа 1).
Окраска гематоксилин-эозином, увеличение 10×90 .

▶ Рис. 2. Тонкая кишка крысы при воздействии оУНТ в дозе 0,05 мг/кг (группа 3(2)) через 3 мес после двухнедельного воздействия. Ворсины с апикальным некрозом.

Окраска гематоксилин-эозином, увеличение 10×40 .



◀ Рис. 3. Комплексное воздействие АЕ с оУНТ в дозе 0,05 мг/кг (группа 11(2)) через 3 мес после двухнедельного эксперимента. Ворсины с апикальным некрозом.

Окраска гематоксилин-эозином, увеличение 10×40 .